Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 4, 2025, p. 361-371

Phylogenetic Analysis of Three Isolates of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) from Vineyards in Khorasan Razavi Province Based on The Nucleotide Sequence of a Portion of The Minor Capsid Protein 2 (Cpm2)

S. Gharouni-Kardani[1*], M.R. Karimi Shahri[1], F. Azad Disfani[1], S. Pakbaz[2]

1- Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
(*- Corresponding author's Email: s.gharooni@areeo.ac.ir)

Received: 22-09-2024
Revised: 12-11-2024
Accepted: 10-12-2024
Available Online: 03-03-2025

How to cite this article:
Gharouni-Kardani, S., Karimi Shahri, M.R., Azad Disfani, F., & Pakbaz, S. (2025). Phylogenetic analysis of three isolates of grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) from vineyards in Khorasan Razavi province based on the nucleotide sequence of a portion of the minor capsid protein 2 (Cpm2). *Iranian Plant Protection Research*, *38*(4), 361-371. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.89928.1204

Introduction

Grapevines, as a vital agricultural product, face significant challenges from pests and diseases that adversely affect both quality and quantity of the crop. Among these, viruses are particularly detrimental, with 86 different species identified in grapevines. The viruses associated with grapevine leafroll disease (GLD) are considered the most prevalent in vineyards. Specifically, six species of grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs), belonging to the family *Closteroviridae*, are linked to this disease. These viruses typically enter vineyards through infected cuttings and are disseminated by vectors, notably mealybugs. The symptoms of GLD manifest as downward rolling of leaf margins, leaf interveinal reddening, and leaf interveinal chlorosis across various grapevine varieties. These symptoms negatively impact the quality of the berries, ultimately affecting yield and marketability. The GLRaV-1 genome is composed of positive-strand RNA and contains ten open reading frames (ORFs), which play crucial roles in its biology and pathogenicity. In Iran, GLRaV-1 has been identified as one of the most widespread grapevine viruses, exhibiting high genetic diversity that complicates management and control efforts. This study focuses on the identification of GLRaV-1 and the phylogenetic analysis of its isolates in the vineyards of Razavi Khorasan province. By understanding the genetic relationships and variability of GLRaV-1 isolates, this research aims to provide insights which could be useful for designing effective management strategies and improving the overall health of grapevine in the region.

Materials and Methods

In the spring of 2020, a study was conducted in the Kashmar region of Khorasan Razavi province, focusing

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.89928.1204

on grapevine plants exhibiting distinct symptoms of viral infection. A total of 70 samples were collected from affected plants. The RNA was extracted from these samples to facilitate the detection of grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). The initial identification process involved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). This method confirmed the presence of GLRaV-1 in 22 samples, marking a crucial step in understanding the viral infection's prevalence. To ensure the accuracy of the RT-PCR results, Sanger sequencing was used on the amplified fragments from three selected samples. This technique provided definitive confirmation of the viral identity by analyzing the nucleotide sequences, thereby validating the initial findings from the RT-PCR. Data analysis included several critical components. Nucleotide sequence similarity analysis was performed to compare the identified GLRaV-1 isolates against known sequences in databases, assessing their similarity and identifying potential genetic variants. Following this, multiple sequence alignments were conducted using MAFFT software, arranging the sequences to highlight similarities and differences among the isolates. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum-Likelihood method with MEGA7 software.

Results and Discussion

The samples collected from black grape vineyards in Kashmar exhibited mild yellowing and downward rolling of leaf margins, symptoms commonly associated with increased anthocyanin levels in red grape varieties. In samples infected with GLRaV-1, a fragment of the minor capsid protein 2 (Cpm2) gene was successfully amplified, while no such fragments were detected in healthy plants. This indicates the presence of GLRaV-1, a virus recognized as one of the common pathogens affecting grapes across various regions of Iran. The GLRaV-1 is primarily transmitted through vectors or contaminated cuttings, which emphasizes the importance of monitoring and controlling these pathways to prevent outbreaks. Sequence comparisons revealed that nucleotide identity among Iranian isolates ranged from 84.2% to 100%, while identity with GenBank isolates varied between 77.6% and 87.7%. This high level of genetic diversity among the isolates may enhance the virus's adaptability to different grape varieties, posing challenges for management and control. The observed diversity at the genomic level was consistent with previously reported data regarding the sequence divergence between the two GLRaV-1 groups (Alabi *et al.*, 2011; Sabella et al., 2018; Fan et al., 2015). Phylogenetic analysis further demonstrated that Iranian isolates of GLRaV-1 clustered into two main groups, indicating that the phylogenetic relationships are not strictly related to geographical origin. In previous studies, global isolates of GLRaV-1 have also been distinguished into two different groups based on the gene encoding the minor coat protein 2 (Alabi *et al.*, 2011; Elci, 2019). This finding suggests that spread of the virus may occur independently of the location, highlighting the need for comprehensive management strategies. To mitigate the spread of GLRaV-1, the use of virus-free plant materials is essential (Alabi *et al.*, 2011; Bruisson *et al.*, 2017). Genetic diversity of GLRaV-1 significantly influences the epidemiology of grapevine leafroll disease, underscoring the importance of producing virus-free plants. Continued research is crucial to understand the underlying causes and effects of this virus. Additionally, developing more sensitive and specific diagnostic tests, along with new control strategies, is vital for effectively managing GLRaV-1 and safeguarding grapevine health.

Keywords: *Ampelovirus univitis*, *Closteroviridae*, Coat protein, Phylogenetic analysis, RT-PCR

پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸ شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳، ص. ۳۷۱-۳۶۱

واکاوی تبارزائی سه جدایه ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره یک (GLRaV-1) از تاکستان‌های استان خراسان رضوی براساس توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن CPm2

سارا قارونی کاردانی[1*]- محمودرضا کریمی شهری[1]- فاطمه آزاد دیسفانی[1]- سمیرا پاکباز[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰

چکیده

انگور (*Vitis vinifera* L.) به‌عنوان یک محصول کشاورزی مهم در جهان، میزبان طیف وسیعی از ویروس‌های گیاهی از جمله ۸۶ گونه ویروس شناخته شده است. یکی از این ویروس‌ها، ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره یک (Grapevine leafroll-associated virus 1, GLRaV-1) است که به جنس *Ampelovirus* و خانواده Closteroviridae تعلق دارد. با توجه به تغییرات اخیر در نام‌گذاری گونه‌های ویروسی، نام این گونه *Ampelovirus univitis* شده است. در این مطالعه در بهار سال ۱۳۹۹، آلودگی به GLRaV-1 در تاکستان‌های شهرستان کاشمر، استان خراسان رضوی مورد بررسی قرار گرفت. علائم مشاهده‌شده در تاک‌های آلوده شامل زردی خفیف، تاخوردگی حاشیه برگ به پشت و قرمزی پهنک همراه با رگبرگ‌های سبز بود. ۷۰ نمونه از تاک‌های مشکوک به آلودگی جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۲۲ نمونه (۳۱/۴ درصد از نمونه‌ها) به ویروس GLRaV-1 آلوده بودند. توالی‌یابی ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ (ORF CPm2) ویروس از سه نمونه انجام شد. توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank مقایسه شدند و نتایج نشان داد که توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های این مطالعه، شباهت ۸۷/۷ تا ۷۷/۶ درصدی با توالی‌های GLRaV-1 موجود در GenBank داشتند. درخت تبارزایی براساس بخشی از توالی نوکلئوتیدی ژن CPm2 بازسازی شد. جدایه‌های شمال شرق ایران با جدایه‌های سایر کشورها در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهنده عدم ارتباط خوشه‌بندی تبارزایی با منشأ جغرافیایی می باشد. این یافته نشان می‌دهد که ویروس GLRaV-1 می‌تواند به‌راحتی در بین مناطق مختلف جغرافیایی جابه‌جا شود و تهدیدی جدی برای تاکستان‌ها در سراسر جهان محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Ampelovirus univitis*، پروتئین پوششی، تحلیل تبارزائی، کلستروویریده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز رونویسی معکوس

مقدمه

همانند سایر محصولات، انگور (*Vitis vinifera* L.) نیز توسط آفات و بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا مختلف تهدید می‌شود و کمیت و کیفیت محصول آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. انگورها میزبان ۸۶ گونه ویروس مختلف هستند که این امر باعث می‌شود که به‌عنوان بزرگ‌ترین میزبان کشت‌شده برای ویروس‌ها شناخته شوند (Al Rwahnih *et al.*, 2021). تنوع ویروم انگور به‌دلیل تکامل همزمان ویروس‌ها با گونه‌های *Vitis* و همچنین تاریخ طولانی اهلی شدن درختچه‌های مو و تجارت جهانی این محصول بالا است (Mannini & Digiaro, 2017). بنابراین، بررسی تنوع ژنتیکی، پراکنش و رویدادهای نوترکیب احتمالی این پاتوژن‌ها بسیار مهم است (Panno *et al.*, 2018). در این میان، ویروس‌های مرتبط با بیماری

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: s.gharooni@areeo.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.89928.1204

پیچیدگی برگ انگور (Grapevine leafroll disease, GLD) شایع‌ترین بیماری در تاکستان‌ها شناخته شده‌اند و از اهمیت اقتصادی بالایی در سراسر جهان برخوردار هستند (Meng *et al.*, 2017). شش گونه ویروس همراه با پیچیدگی برگ انگور (GLRaVs) با شماره‌های Grapevine leafroll-associated virus 1، 2-، 3-، 4-، 7- و 13- شناخته شده‌اند. مجموعه ویروس‌های GLRaVها متعلق به خانواده *Closteroviridae* و GLRaV-1 متعلق به جنس *Ampelovirus* است (Dolja *et al.*, 2017). ابو غانم-سباناذزوویچ و همکاران (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2017)، تجدید نظر جدیدی در ساختار طبقه‌بندی جنس *Ampelovirus* ارائه کردند. در این بررسی، جنس *Ampelovirus* به دو زیرگروه تقسیم شد: زیرگروه I شامل GLRaV-1، 3- و 13- که دارای ژنوم بزرگ‌تر و ۹ تا ۱۲ فریم خوانش باز (ORF) هستند. زیرگروه II شامل GLRaV-4 و سویه‌های آن مانند 5-، 6-، 9-، Pr- و Car.- که دارای ژنوم کوچک‌تر و شش ORF هستند. در حال حاضر، ۱۳ گونه در طبقه‌بندی جدید در جنس *Ampelovirus* قرار دارند (ICTV, 2023).

ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ انگور عمدتاً به آوند آبکش محدود می‌شوند و به‌طور پراکنده در گیاهان توزیع می‌شوند (Naidu *et al.*, 2014). ازآن‌جایی‌که انگورها به‌صورت رویشی تکثیر می‌شوند، این ویروس‌ها معمولاً از طریق قلمه آلوده به تاکستان‌ها وارد می‌شوند و سپس توسط برخی از ناقلین GLRaV مانند شپشک‌های آردآلود (*Hemiptera*: *Pseudococcidae*) منتشر می‌شوند (Almeida *et al.*, 2013).

عمده علائم بیماری پیچیدگی برگ انگور شامل پیچیدگی حاشیه برگ به‌سمت پشت برگ، قرمز شدن بین رگبرگی برگ در ارقام انگور قرمز و کلروز بین رگبرگی برگ در ارقام سفید می‌شود. این علائم می‌تواند باعث افت کیفیت و عملکرد حبه‌ها شود و ویژگی‌هایی مانند سطح قند، بلوغ و رنگدانه را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد (Poojari *et al.*, 2017).

ژنوم GLRaV-1 از یک RNA رشته‌ای تک لای مثبت به‌طول تقریبی ۱۸/۷ تا ۱۸/۹ کیلوباز تشکیل شده است که در ذرات رشته‌ای محصور شده است. ژنوم حاوی ۱۰ چارچوب ژنی (ORFs) است که ۱۰ پروتئین هلیکاز (ORF1a)، پلیمراز (ORF1b)، p7 (ORF2)، پروتئین شوک حرارتی (ORF3)، p55 (ORF4)، پروتئین پوششی (ORF5)، پروتئین پوششی فرعی ۱ (ORF6)، پروتئین پوششی فرعی ۲ (ORF7)، p21 (ORF8) و p24 (ORF9) را رمزگذاری می‌کند (Donda *et al.*, 2017).

بیماری GLD به‌طور گسترده در سراسر جهان گسترش دارد و تقریباً در تمام تاکستان‌ها (اروپا، آمریکای شمالی و جنوبی، آسیا، آفریقا و اقیانوسیه) ردیابی شده است (Caruso *et al.*, 2022). در دهه گذشته، در ایالات متحده آمریکا (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2015)، نیجریه (Zongoma *et al.*, 2017)، پاکستان (Rasool *et al.*, 2019) و روسیه (Porotikova *et al.*, 2019) نیز گزارش شده است.

ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷ و ۹ GLRaV در چندین مطالعه در مناطق مختلف کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، چهارمحال و بختیاری، خراسان رضوی، خراسان شمالی، کهگیلویه و بویراحمد، فارس و قزوین گزارش شده‌اند و GLRaV-1 به‌عنوان غالب‌ترین ویروس شناسایی شده است (Naderpour *et al.*, 2018; Roomi *et al.*, 2006; Gholampour *et al.*, 2024; Pourrahim *et al.*, 2004; Rakhshandehroo *et al.*, 2005). تنوع ژنتیکی بالای درون گونه‌ای در GLRaV-1 گزارش شده است و تا هشت گروه فیلوژنتیکی مجزا برای آن شناسایی شده است (Bruisson *et al.*, 2017; Sabella *et al.*, 2018). این تنوع ژنتیکی بالا، چالش اساسی برای مهار GLRaV-1 به‌وجود می‌آورد. اطلاعات محدودی در مورد تنوع ژنتیکی GLRaV-1 در ایران دسترس است. طبق آمارنامه کشاورزی سال ۱۴۰۲ (جلد سوم: محصولات باغبانی)، خراسان رضوی رتبه چهارم کشور را در تولید انگور دارا بوده است. ازآنجاکه این استان به‌عنوان یکی از مناطق اصلی کشت انگور در ایران شناخته می‌شود، بنابراین نیاز به اطلاعات بیشتر برای شناسایی ویروس‌های انگور به‌خصوص GLRaVs از تاکستان‌های این استان است. هدف از این مطالعه، ردیابی GLRaV-1 از تاکستان‌های استان خراسان رضوی در شمال شرق ایران، توالی‌یابی بخشی از ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ (ORF CPm2) ویروس و نیز تحلیل تبارزائی جدایه‌های مختلف GLRaV-1 بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، استخراج RNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

طی بهار سال ۱۳۹۹ از تاکستان‌های شهرستان کاشمر استان خراسان رضوی از ۷۰ تاک دارای علائم مشکوک به بیماری ویروسی نمونه‌برداری انجام شد. استخراج آر.ان.ای از تراشه‌های پوست سبز ساقه و برگ‌های جوان مو، با استفاده از بافر (Cetyl-trimethylammonium bromide, CTAB) انجام شد (Gharouni-Kardani *et al.*, 2022; Gholampour & Zakiaghl, 2016). از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی LEV1-C447 و LQV1-H47 (جدول ۱) ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره یک، جهت ردیابی مولکولی ویروس فوق استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر و

۱۰ میکرولیتـر کیـت PCR (Denmark, Ampliqon Red Dye Master Mix) بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مـراز شـامل یک مرحله در دمای ۹۵ درجـه سـانتی‌گراد به‌مـدت سـه دقیقـه و ۳۵ چرخه، شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مـدت ۳۰ ثانیـه در مرحلـه واسرشته‌سازی، دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیـه و دمـای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیـه و در انتهـا یـک مرحلـه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بـا اسـتفاده از ترموسـایکلر (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler، USA) انجام شد.

جدول ۱– مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای مطالعه GLRaV-1

Table 1- Characteristics of specific primers used for study of GLRaV-1

name Primer	Sequence	Size	Region	Reference
LQV1-H47	5'- GTTACGGCCTTTTGTTTATTATGG -3'	398	Coat protein duplicate 2	Roomi *et al.*, 2006
LEV1-C447	5'- CGACCCCTTTATTGTTTGAGTATG -3'			

محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حـاوی دو میکرولیتـر از Green Viewer الکتروفورز و در نهایت با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Alphaimager Mini ProteinSimple، USA) تصویربرداری شد. تأیید صحت قطعات همانندسازی‌شده با آغـازگر اختصاصـی رفـت، از طریق تعیین توالی یک‌طرفه توسط شـرکت مـاکروژن (Macrogen) کره جنوبی، انجام شد.

واکاوی داده‌ها

تجزیه و تحلیل شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افـزار SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014) و هم‌ردیف‌سـازی چندگانه جدایه‌های این مطالعه و جدایه‌های موجود در GenBank بـا استفاده از نرم‌افزار MAFFT نسخه هفت انجام شد (Katoh *et al.*, 2019). پس از انتخاب بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار MEGA7، رسم درخت تبارزائی به‌روش Maximum-Likelihood (ML) با ۱۰۰۰ تکرار در آزمون بوت‌استرپ انجـام شـد (Kumar *et al.*, 2016).

نتایج و بحث

ارقـام انگـور سـیاه جمـع‌آوری‌شـده طـی بهـار سـال ۱۳۹۹ از تاکستان‌های شهرستان کاشمر استان خراسان رضـوی، دارای علائـم زردی خفیف و تاخوردگی حاشـیه بـرگ بـه پشـت و قرمـزی پهنـک برگ‌ها با رگبرگ‌های سبز بودند (شکل ۱). این علائم خـاص ارقـام انگور قرمـز اسـت (Poojari *et al.*, 2017). ظهـور علائـم مختلـف به‌علت افزایش غلظت آنتوسیانین در ارقام انگور قرمز می‌باشد، زیرا در ارقام سفید جهش‌های متعددی در مسیر ژن‌های بیوسنتز فلاونوئید رخ می‌دهد (Gutha *et al.*, 2010).



شکل ۱– علائم ویروسی مشاهده‌شده در نمونه¬های آلوده به GLRaV-1 در تاکستان‌های استان خراسان رضوی شامل پیچیدگی حاشیه برگ به طرف پایین و قرمزی پهنک برگ‌ها در رقم انگور سیاه آلوده

Figure 1- Viral symptoms including downward rolling of leaf margins, leaf interveinal reddening in red grapevine cultivars in vineyards of Khorasan Razavi infected with GLRaV-1

در ۲۲ نمونه آلوده به GLRaV-1 قطعه‌ای به‌طول ۳۹۸ جفت باز مربوط به بخشی از چارچوب ژنی پروتئین پوششـی فرعـی ۲ (ORF CPm2) ویروس تکثیر گردید، درحالی‌که در گیاه سالم هیچ قطعـه‌ای تکثیر نشد. قطعات همانندسازی‌شده با آغازگرهای اختصاصی که روی

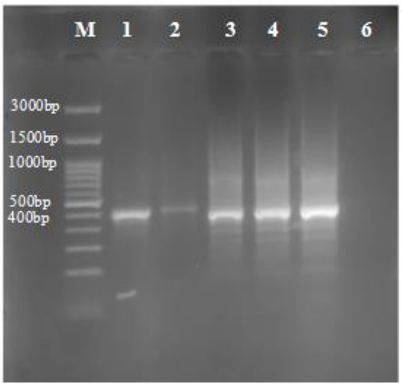
ژل آگارز یک درصد مشاهده شد، تعیین توالی گردید (شکل ۲)، پس از تعیین توالی سه نمونه آلوده منتخب، آلودگی انگورها به ویروس GLRaV-1 تأیید شد. GLRaV-1 یکی از بیمارگرهای ویروسی رایج انگور است که از تمام موکاری‌های دنیا گزارش شده است (Meng et al., 2017). GLRaV-1 پیشتر از تاکستان‌های استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کهگیلویه و بویراحمد، قزوین، فارس، خراسان رضوی، خراسان شمالی و چهارمحال و بختیاری گزارش شده بود (Roomi et al., 2006; Naderpour et al., 2018; Rakhshandehroo et al., 2005; Pourrahim et al., 2004). توالی‌های خام توسط نرم‌افزار MEGA7 ویرایش شد و توالی به‌دست آمده در ژن‌بانک با رس شمارهای PP069515، PP069516 و PP069517 ثبت شد (جدول ۲).

نتایج تحلیل تبارزائی بخشی از ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ جدایه‌های GLRaV-1 از ایران و ۴۳ جدایه موجود در GenBank (جدول ۲) به دو گروه اصلی منجر شد (شکل ۳) که نشان‌دهنده شیوع گسترده این ویروس و تنوع ژنتیکی بالای آن است. جدایه‌های ایران با جدایه‌های سایر کشورها (شیلی، ژاپن، اسپانیا و روسیه) گروه‌بندی شدند. طبق مطالعات قبلی (Sabella et al., 2018)، به نظر نمی‌رسد که شاخه‌بندی فیلوژنتیک با منشأ جغرافیایی مرتبط باشد. این عدم ارتباط بین شاخه‌بندی فیلوژنتیک و منشأ جغرافیایی نشان می‌دهد که ویروس عمدتاً از طریق تماس با گیاهان آلوده منتقل نمی‌شود، بلکه از راه‌های دیگر مانند ناقلین یا قلمه‌های آلوده منتقل می‌شود (Elci, 2019).

مقایسه توالی سه جدایه GLRaV-1 توالی‌یابی‌شده به همراه جدایه‌های موجود در GenBank نشان داد که همسانی نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی با یکدیگر ۱۰۰–۸۴/۲ درصد و با جدایه‌های GenBank ۸۷/۷ –۷۷/۶ درصد بود (شکل ۴). این نتایج حاکی از وجود تنوع بالایی درون گونه‌ای برای این ویروس است. تنوع مشاهده شده در سطح ژنوم با داده‌های گزارش‌شده قبلی در مورد فاصله توالی بین دو گروه GLRaV-1 مطابقت داشت (Alabi et al., 2011; Sabella et al., 2018; Fan et al., 2015).

در مطالعات گذشته، جدایه‌های جهانی GLRAV-1 براساس ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ به دو گروه متفاوت متمایز شده‌اند (Alabi et al., 2011; Elci, 2019). بررسی تبارزایی توالی کامل جدایه‌های ایرانی GLRAV-1 و جدایه‌های متناظر از بانک ژن، در درخت فیلوژنتیک، جدایه‌های GLRAV-1 در دو شاخه مجزا با پشتیبانی اعتبارسنجی بالا قرار گرفتند (Gholampour et al., 2024).

واکاوی ژن‌های مختلف GLRaV-1، تنوع درون و بین‌گونه‌ای را نشان می‌دهند که نشان‌دهنده فشار انتخاب و رویدادهای نوترکیبی احتمالی است (Fan et al., 2015). پیامدهای این تنوع ژنتیکی شامل سازگاری ویروس با ارقام مختلف انگور، تأثیر قلمه و شرایط محیطی بر آلودگی ویروسی و تأثیر آن بر فیزیولوژی انگور، کیفیت میوه و بیان ژنی است (Song et al., 2021). با توجه به عدم ارتباط فیلوگروه‌های GLRAV-1 براساس ارقام مختلف انگور (Gholampour et al., 2024) و عدم گروه‌بندی فیلوژنتیکی مشخص براساس منشأ جغرافیایی (Sabella et al., 2018; Elci, 2019)، تأکید بر استفاده از قلمه‌های عاری از ویروس به منظور جلوگیری از انتشار این ویروس ضروری است (Alabi et al., 2011; Bruisson et al., 2017).



شکل ۲– الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد با جفت آغازگر اختصاصی (LQV1-H47/ LEV1-C447)

راهک‌های ۱ تا ۴: نمونه‌های آلوده به GLRaV-1 جمع‌آوری‌شده از استان خراسان رضوی. راهک شماره ۵: شاهد مثبت، راهک شماره ۶: شاهد منفی. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی پلاس (سینا کلون، SL7041).

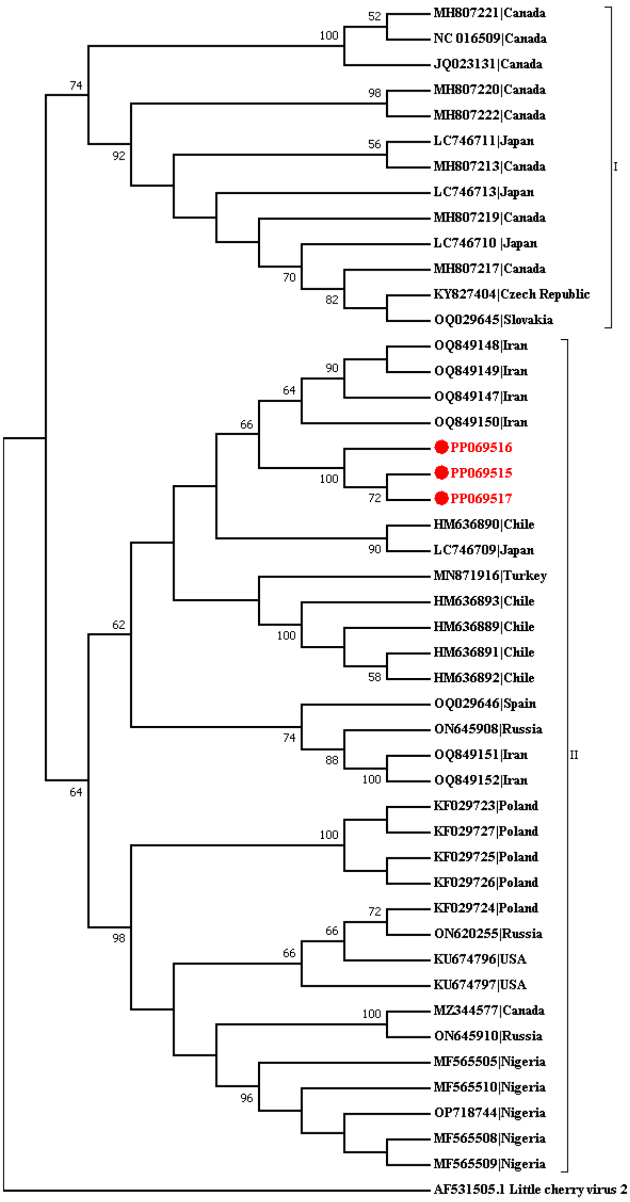
Figure 2- Electrophoresis of the RT-PCR product in 1% agarose gel using specific primers (LQV1-H47/ LEV1-C447)

Lane 1-4: GLRaV-1infected samples from Khorasan Razavi vineyards, Lane 5: positive control, Lane 6: negative control, M: 100bp DNA ladder plus (Sinaclon, SL7041).

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های GLRaV-1 مورد استفاده در واکاوی‌های مولکولی در این تحقیق. جدایه‌های توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر با علامت * مشخص شده‌اند. میزبان همه جدایه‌ها *Vitis vinifera* می باشد.

Table 2- Characteristics of GLRaV-1 isolates that were used in molecular analyses in this study. The sequenced isolates in this study are showed with *. The host of all isolates is *Vitis vinifera*

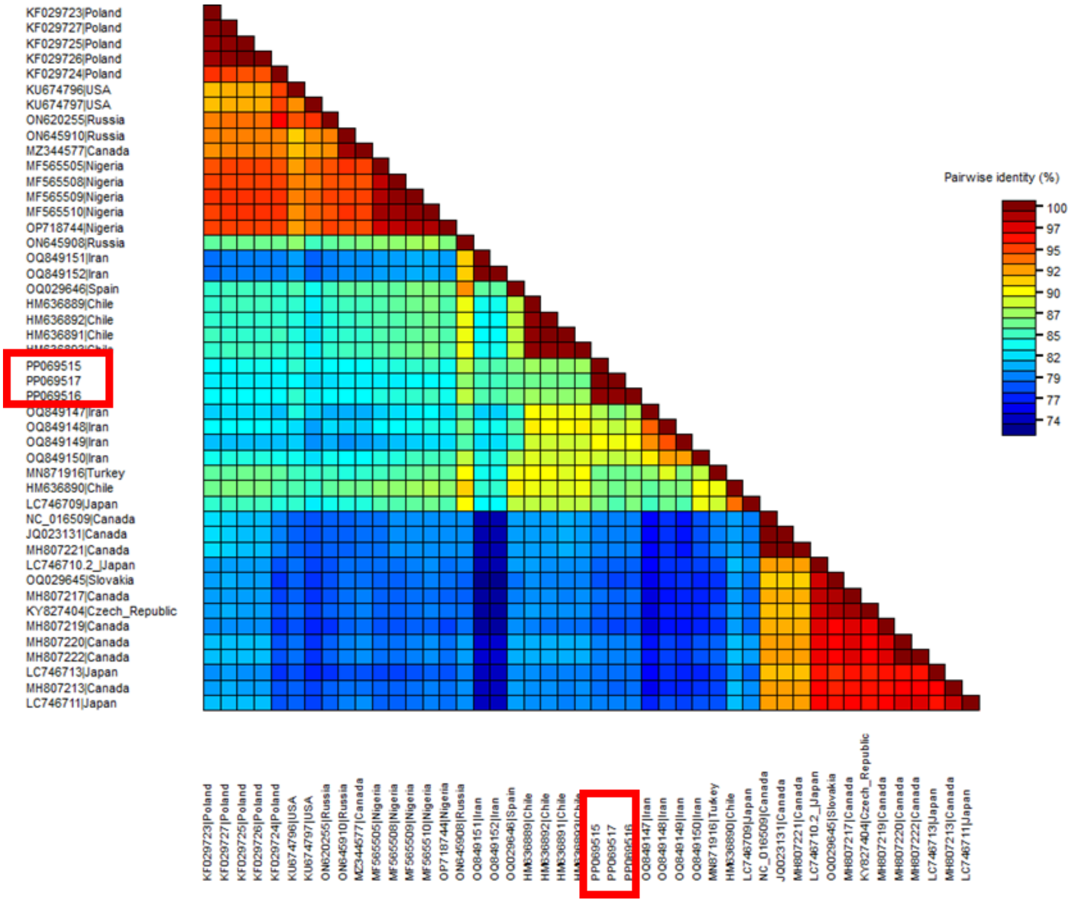
Accession no.	Origin
HM636889	Chile
HM636890	Chile
HM636891	Chile
HM636892	Chile
HM636893	Chile
JQ023131	Canada
KF029723	Poland
KF029724	Poland
KF029725	Poland
KF029726	Poland
KF029727	Poland
KU674796	USA
KU674797	USA
KY827404	Czech Republic
LC746709	Japan
LC746710	Japan
LC746711	Japan
LC746713	Japan
MF565505	Nigeria
MF565508	Nigeria
MF565509	Nigeria
MF565510	Nigeria
MH807213	Canada
MH807217	Canada
MH807219	Canada
MH807220	Canada
MH807221	Canada
MH807222	Canada
MN871916	Turkey
MZ344577	Canada
NC_016509	Canada
ON620255	Russia
ON645908	Russia
ON645910	Russia
OP718744	Nigeria
OQ029645	Slovakia
OQ029646	Spain
OQ849147	Iran
OQ849148	Iran
OQ849149	Iran
OQ849150	Iran
OQ849151	Iran
OQ849152	Iran
** PP069515	Iran
**PP069516	Iran
**PP069517	Iran



شکل ۳- درخت تبارزائی جدایه‌های GLRAV-1 براساس توالی‌های نوکلئوتیدی قسمتی از ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ (۳۹۸ جفت باز) با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 بازسازی شد. مقادیر اعتبارسنجی (۱۰۰۰ تکرار) بر شاخه‌ها نشان داده شده است. مقادیر اعتبارسنجی کمتر از ۵۰ نمایش داده نشده‌اند. جدایه‌های ایرانی GLRAV-1 به رنگ قرمز • نشان داده شده‌اند.

Figure 3- The phylogenetic tree of GLRAV-1 strains was reconstructed based on the nucleotide sequences of a portion of the minor capsid protein 2 gene (398 base pairs) using MEGA7 software. Bootstrap values (1000 replicates) are shown on the branches. Bootstrap values less than 50 are not displayed. Iranian GLRAV-1 strains are highlighted in red•.

تنوع ژنتیکی GLRaV-1 نقش حیاتی در همه‌گیری بیماری پیچیدگی برگ انگور و تولید گیاهان عاری از ویروس را دارد (Fan *et al.*, 2015). لذا نیاز به انجام تحقیقات بیشتر جهت درک علل تنوع ژنتیکی و اثرات آن بر توانایی ویروس در آلودگی و آسیب به انگور وجود دارد. برای تشخیص و مدیریت GLRAV-1 نیاز به راه‌حل‌های مؤثرتر شامل توسعه تست‌های تشخیصی حساس‌تر و اختصاصی‌تر و نیز توسعه راهکارهای کنترلی جدید در برابر تمام جدایه‌های ویروس است.



شکل ۴- ماتریکس مقایسه دوبه‌دو توالی‌های نوکلئوتیدی بخشی از ژن پروتئین پوششی فرعی ۲ متعلق به سه جدایه ایرانی (مستطیل قرمز رنگ) با ۴۴ جدایه منتخب از GenBank با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2

Figure 4- Nucleotide pairwise identity matrix of partial ORF CPm2 sequences of three Iranian isolates (red circle) with 44 selected isolates from GenBank using SDT v1.2 software

نتیجه‌گیری

آلودگی به ویروس GLRaV-1 در ۲۲ نمونه آلـوده دارای علائـم زردی خفیف و قرمـزی برگ‌هـا تأییـد گردیـد. GLRaV-1 یکـی از ویروس‌های رایج در انگور است که در چندین اسـتان ایـران گـزارش شده است. تحلیل تبارزایی نشان داد که جدایـه‌های ایرانـی و جهـانی این ویروس تنوع ژنتیکی بالایی دارنـد و ارتبـاطی بـین فیلوژنتیـک و منشأ جغرافیایی وجود ندارد. این تنوع می‌تواند بر سازگاری ویروس بـا ارقام مختلف انگور تأثیر بگذارد و نیاز به تحقیقات بیشـتر بـرای درک بهتر آن احساس می‌شود. در نهایت، توسـعه روش‌هـای تشخیصـی و کنترلی جدید برای مدیریت GLRaV-1 ضروری است.

References

1. Aboughanem-Sabanadzovic, N., & Sabanadzovic, S. (2015). First report of grapevine leafroll-associated virus 2 infecting muscadine (*Vitis rotundifolia*) and summer grape (*Vitis aestivalis*) in the United States. *Plant Disease*, *99*(1), 163-163. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1252-PDN
2. Aboughanem-Sabanadzovic, N., Maliogka, V., & Sabanadzovic, S. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 4. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, 197-220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-79
3. Al Rwahnih, M., Alabi, O.J., Hwang, M.S., Tian, T., Mollov, D., & Golino, D. (2021). Characterization of a new nepovirus infecting grapevine. *Plant Disease*, *105*(05), 1432-1439. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1831-RE
4. Alabi, O. J., Al Rwahnih, M., Karthikeyan, G., Poojari, S., Fuchs, M., Rowhani, A., & Naidu, R.A. (2011). Grapevine leafroll-associated virus 1 occurs as genetically diverse populations. *Phytopathology*, *101*(12), 1446-

1456. https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0114

5. Almeida, R.P., Daane, K.M., Bell, V.A., Blaisdell, G.K., Cooper, M.L., Herrbach, E., & Pietersen, G. (2013). Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 94. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094
6. Bruisson, S., Lebel, S., Walter, B., Prevotat, L., Seddas, S., & Schellenbaum, P. (2017). Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan® RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods*, *240*, 73-77. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.003
7. Caruso, A.G., Bertacca, S., Ragona, A., Matić, S., Davino, S., & Panno, S. (2022). Epidemiological survey of grapevine leafroll-associated virus 1 and 3 in sicily (Italy): Genetic structure and molecular variability. *Agriculture*, *12*(5), 647. https://doi.org/10.3390/agriculture12050647
8. Dolja, V.V., Meng, B., & Martelli, G.P. (2017). Evolutionary aspects of grapevine virology. *Grapevine Viruses: Molecular Biology*, *Diagnostics and Management, 1,* 659-688. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_32
9. Donda, B.P., Jarugula, S., & Naidu, R.A. (2017). An analysis of the complete genome sequence and subgenomic RNAs reveals unique features of the ampelovirus, Grapevine leafroll-associated virus 1. *Phytopathology*, *107*(9), 1069-1079. https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0061-R
10. Elci, E. (2019). Genomic variability and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus-1 isolates from Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, *25*(3), 319-327. https://doi.org/10.15832/ankutbd.402162
11. Fan, X., Hong, N., Dong, Y., Ma, Y., Zhang, Z.P., Ren, F., Hu, G., Zhou, J., & Wang, G. (2015). Genetic diversity and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus 1 from China. *Archives of Virology*, *160*, 1669-1678. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2437-8
12. Gharouni-kardani, S., Karimi shahri, M. R., Azad disfani, F. (2022). Distribution and Phylogeny of Grapevine fanleaf virus in Vineyards of Khorasan Razavi Province Based on Coat Protein Region. *Journal of Iranian Plant Protection Research*,; 35(4): 421-431. https://doi.org/10.22067/jpp.2021.68789.1010
13. Gholampour, Z., & Zakiaghl, M. (2016). Comparison of RNA extraction methods for the identification of grapevine fanleaf virus. *Journal of Iranian Plant Protection*, *30*(1), 127-33. https://doi.org/10.22067/jpp.v30i1.40075
14. Gholampour, Z., Zakiaghl, M., Asquini, E., Moser, M., Gualandri, V., Mehrvar, M., & Si-Ammour, A. (2024). Application of high-throughput sequencing for comprehensive virome profiling in grapevines shows yellows in Iran. *Viruses*, *16*(2), 204. https://doi.org/10.3390/v16020204
15. Gutha, L.R., Casassa, L.F., Harbertson, J.F., & Naidu, R.A. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology*, *10*, 1-18. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-187
16. International Committee on Taxonomy of Viruses, (2023). (ICTV): https://ictv.global/taxonomy/
17. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1160-1166. https://doi.org/10.1093/bib/bbx108
18. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870-1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054
19. Mannini, F., & Digiaro, M. (2017). The effects of viruses and viral diseases on grapes and wine. In: Meng, B., Martelli, G., Golino, D., Fuchs, M. (eds). *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, 453-482. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_23
20. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M. (2017*). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7
21. Muhire, B.M., Varsani, A., & Martin, D.P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One*, *9*(9), e108277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277
22. Naderpour, M., Shahbazi, R., Alizadeh, A., Karimi, S., Tabei, M., Hajizadeh, M., & Hosseinibay, K. (2018). The status of grapevine leafroll-associated viruses in Iran. In: *XXX International Horticultural Congress IHC2018: II International Symposium on Innovative Plant Protection in Horticulture 1269.* Istanbul. p. 113-118.
23. Naidu, R.A., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., & Martelli, G.P. (2014). Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, *98*(9), 1172-1185. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE
24. Panno, S., Caruso, A.G., Troiano, E., Luigi, M., Manglli, A., Vatrano, T., Iacono, G., Marchione, S., Bertin, S., Tomassoli, L., Parrella, G., Davino, S. (2019). Emergence of tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: Estimation of incidence and genetic diversity. *Plant Pathology*, *68*(3), 601-608. https://doi.org/10.1111/ppa.12978
25. Poojari, S., Boulé, J., DeLury, N., Lowery, D.T., Rott, M., Schmidt, A.M., & Úrbez-Torres, J.R. (2017). Epidemiology and genetic diversity of grapevine leafroll-associated viruses in British Columbia. *Plant Disease*, *101*(12), 2088-2097. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0497-RE
26. Porotikova, E.V., Dmitrenko, U.D., Yurchenko, E.G., & Vinogradova, S.V. (2019). First Report of Grapevine Leafroll-Associated Virus 2 in Russian Grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Disease*, *103*(1), 164-164.

https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0749-PDN

27. Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Farzadfar, S., Rakhshandehro, F., & Golnaraghi, A.R. (2004). Occurrence of Arabis mosaic virus and grapevine leaf roll associated virus-3 on grapevines in Iran. *Plant Disease*, *88*(4), 424-424. https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.4.424A
28. Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamani Zadeh, H., Rezaee, S., & Mohammadi, M. (2005). Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology*, *153*(7-8), 480-484. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01006.x.
29. Rasool, S., Naz, S., Rowhani, A., Diaz-Lara, A., Golino, D.A., Farrar, K.D., & Al Rwahnih, M. (2019). Survey of grapevine pathogens in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, *101*, 725-732. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00263-0
30. Roomi, V., Afsharifar, A., & Izadpanah, K. (2006). Identification, distribution and prevalence of grapevine leafroll associated viruses and grapevine virus A in Iran and their rate of incidence in grapevine cultivars. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *42*, 223–240. (In Persian with English abstract).
31. Sabella, E., Pierro, R., Luvisi, A., Panattoni, A., D'Onofrio, C., Scalabrelli, G., Nutricati, E., Aprile, A., De Bellis, L., Materazzi, A. (2018). Phylogenetic analysis of viruses in Tuscan *Vitis vinifera* sylvestris (Gmeli) Hegi. *PLoS One*, *13*(7), e0200875. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200875
32. Song, Y., Hanner, R.H., & Meng, B. (2021). Probing into the effects of grapevine leafroll-associated viruses on the physiology, fruit quality and gene expression of grapes. *Viruses*, *13*(4), 593. https://doi.org/10.3390/v13040593
33. Zongoma, A.M., Dangora, D.B., Al Rwahnih, M., Bako, S.P., Alegbejo, M.D., & Alabi, O.J. (2017). First report of grapevine leafroll-associated virus 1 infecting grapevines (*Vitis* spp.) in Nigeria. *Plant Disease*, *102*(1), 258-258. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1120-PDN